

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006116

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-102017
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 2 0 1 7

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 1 0 2 0 1 7
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): オムロン株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 04P00546
【提出日】 平成16年 3月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 21/27
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町801番地 オムロン株式会社内
 【氏名】 松下 智彦
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町801番地 オムロン株式会社内
 【氏名】 青山 茂
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町801番地 オムロン株式会社内
 【氏名】 西川 武男
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町801番地 オムロン株式会社内
 【氏名】 長岡 真吾
【特許出願人】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台1-1-D30-105千里藤白台リッツハウスD30
 【氏名】 和沢 鉄一
【特許出願人】
 【識別番号】 000002945
 【住所又は居所】 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町801番地
 【氏名又は名称】 オムロン株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100094019
 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区谷町1丁目3番5号 オグラ天満橋ビル
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中野 雅房
 【電話番号】 (06)6910-0034
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 038508
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9800457

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

透明な基板の表面に凸部又は凹部を有する金属層を形成され、かつ、特異的な検体を吸着する分子認識機能物質を前記基板又は前記金属層に固定されたセンサユニットを備え、

前記センサユニットの前記金属層及び前記分子認識機能物質を設けられた面を発光分子で修飾された検体を含んだ分析試料液に接触させ、前記センサユニットの他方の面に励起光を照射させるようにした局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 2】

前記励起光は、前記基板の表面で全反射する入射角で、前記センサユニットに照射されることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 3】

前記基板の裏面にプリズムを密着させて配置したことを特徴とする、請求項 2 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 4】

前記センサユニットの前記金属層及び前記分子認識機能物質を設けられた面に対向する側に、レンズを介して光検出器を配置したことを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 5】

前記発光分子の発光波長と前記励起光の波長とが異なっていることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 6】

励起光を遮断するためのカットフィルタを前記光検出器の前に配置したことを特徴とする、請求項 5 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 7】

前記凸部を有する金属層は、前記基板の表面に間隔をあけて固定された金属微粒子からなることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 8】

前記凸部を有する金属層は、前記基板の表面に形成された金属薄膜と、前記金属薄膜の上に間隔をあけて固定された金属微粒子とからなることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 9】

前記凸部を有する金属層は、前記基板の表面に間隔をあけて固定された金属微粒子と、前記金属微粒子の上から前記基板表面に形成された金属薄膜とからなることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 10】

前記凹部を有する金属層は、前記基板の表面に形成された金属薄膜に間隔をあけて凹部を形成されたものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 11】

前記凸部又は凹部は、スタンプにより前記基板表面に形成された金属薄膜に型押しすることによって形成されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 12】

前記凸部又は凹部の高さ及び幅が、いずれも 150 nm 以下であることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 13】

前記凸部の形状は、球、楕円球または球もしくは楕円球の一部であることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 14】

前記凸部又は凹部間の間隔の平均値が、前記凸部又は凹部の外形寸法の 2 倍以上 4 倍以下であることを特徴とする、請求項 1 に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 15】

前記金属層は、AuまたはAgからなることを特徴とする、請求項1に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 16】

前記基板又は前記金属層の一部領域に親水処理、疎水処理又は帯電処理を施しておき、当該処理を施されていない領域に前記分子認識機能物質を固定したことを特徴とする、請求項1に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 17】

前記発光分子のモル濃度が100nM以上であることを特徴とする、請求項1に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 18】

前記分析試料液を通過させるための流路を備え、前記分子認識機能物質が流路内に面していることを特徴とする、請求項1に記載の局在プラズモン共鳴センサ。

【請求項 19】

請求項1に記載の局在プラズモン共鳴センサと、前記センサの出力データに基づいて分析試料液を解析する手段とを備えた検査装置。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 局在プラズモン共鳴センサ及び検査装置

【技術分野】

【０００１】

本発明は、局在プラズモン共鳴センサに関し、特に、特異的なリガンドや抗原等を検出するのに適した局在プラズモン共鳴センサ及び検査装置に関する。

【背景技術】

【０００２】

近年、生体分子の相互作用の有無または程度を検出するためのセンサとして、表面プラズモン共鳴センサや局在プラズモン共鳴センサ、全反射蛍光照明センサが用いられている。

【０００３】

図１は従来の全反射蛍光照明センサ１１を示す概略図である。この全反射蛍光照明センサ１１にあつては、ガラス等からなる透明基板１２の上面にAu薄膜等の金属薄膜１３を形成し、金属薄膜１３の上に多数の受容体１４を固定している。また、透明基板１２の下面にはプリズム１６が密着している。

【０００４】

この全反射蛍光照明センサ１１は、受容体１４が分析試料液の流れる流路１７に直接接するように設置される。この分析試料液内のリガンド１５には、予め蛍光分子によって修飾が施されている。そして、透明基板１２と金属薄膜１３との界面における入射角が当該界面における全反射角よりも大きな角度となるようにして、光源１８からプリズム１６に向けて励起光が出射される。このとき、プリズム１６及び透明基板１２を透過した励起光は、金属薄膜１３と透明基板１２の界面で全反射する。そして、金属薄膜１３の裏面にはエバネッセント光が発生し、エバネッセント光の電界は金属薄膜１３や受容体１４を透過して広がる。さらに、エバネッセント光により励起された金属薄膜１３内の表面プラズモンにより、さらに大きな電界が発生する。このエバネッセント光や表面プラズモンによる電界は、受容体１４に結合したリガンド１５の蛍光分子を励起して発光させる。よって、受容体１４に対向配置された光検出器１９によって発光強度を計測することにより、受容体１４に結合した特異的なリガンド１５の有無、もしくは受容体１４に結合したリガンド１５の量を計測することができる。

【０００５】

しかし、エバネッセント光等による電界は、図１に示すように、透明基板１２の表面から２００～３００nmの距離まで染み出しているため、受容体１４と結合したリガンド１５ばかりでなく、受容体１４と結合していないリガンド１５の蛍光分子までが励起されてしまい、計測データに対してノイズとなる。特に、分析試料液中のリガンド１５の濃度が高いほど、このノイズは大きくなる。生体分子の大きさは数十nmであるため、このノイズは全反射蛍光照明センサの測定精度をかなり低下させる原因となっており、検体１分子程度の検出精度を得ることは困難であった。

【０００６】

また、図２は従来の局在プラズモン共鳴センサ２１を示す概略図である（特許文献３）。この局在プラズモン共鳴センサ２１にあつては、ガラス等の透明基板２２の一方表面に直径１０～２０nmのAu等の金属微粒子２３を多数固定してセンサユニット２４を構成している。金属微粒子２３が固定された面と反対側では、光源２５からセンサユニット２４に垂直に光ビームが照射されており、分光光度計２６により金属微粒子２３を透過した光の吸収スペクトルを測定して吸光度を得ることができる。このような局在プラズモン共鳴センサ２１では、波長５２０nm近傍の光に対して強い吸収ピークが表われる。

【０００７】

この局在プラズモン共鳴センサ２１においては、吸光度の変化から金属微粒子近傍における屈折率の変化を検出することができる。また、図３に示すように、センサユニット２４の透明基板２２に固定された金属微粒子２３の表面に受容体２７を吸着させると、

受容体 27 に特異的なリガンド 28 が吸着されたとき、金属微粒子 23 の周囲の屈折率が変化して金属微粒子 23 を透過した光の吸光度が変化するので、特異的なリガンド 28 の有無、もしくはその量を検出することができる。

【0008】

この局在プラズモン共鳴センサでは、金属微粒子を透過した透過光の吸光率を測定するので、全反射蛍光照明センサのようにプリズムを必要とせず、小型化が可能である。また、金属微粒子を用いた場合には、金属薄膜（全反射蛍光照明センサ）に比べて電界が局在化するので、金属微粒子近傍の変化のみを検出することができ、微小領域における検体の測定が可能になると共に、金属微粒子から離れた箇所における検体の影響を小さくすることができる。

【0009】

しかしながら、この方式によると、屈折率の変化はほんのわずかなため、吸光度の変化も非常に小さなものとなる。よって、このような局在プラズモン共鳴センサでも、1 分子程度の検出精度を得ることは困難であった。

【0010】

【特許文献 1】 特開 2000-131237 号公報

【特許文献 2】 特許第 3452837 号

【特許文献 3】 特開平 6-27023 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は上記のような技術的課題に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、従来例に比べて検出精度を高めることができる新規な構成の局在プラズモン共鳴センサ及び検査装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明にかかる局在プラズモン共鳴センサは、透明な基板の表面に凸部又は凹部を有する金属層を形成され、かつ、特異的な検体を吸着する分子認識機能物質を前記基板又は前記金属層に固定されたセンサユニットを備え、前記センサユニットの前記金属層及び前記分子認識機能物質を設けられた面を発光分子で修飾された検体を含んだ分析試料液に接触させ、前記センサユニットの他方の面に励起光を照射させるようにしたことを特徴としている。ここで、検体とはリガンドや抗原などを指すが、生体分子に限らない。分子認識機能物質とは、特異的な検体を選択的に結合させる働きをするものであって、受容体、抗体、酵素などのタンパク質である。分子認識機能物質として生体高分子を用いればバイオセンサとして用いることができるが、局在プラズモン共鳴センサとしては、生体高分子に限らない。発光分子としては、光又は電磁界を照射されたときに蛍光や燐光等のルミネッセンス光を発生するものであればよく、例えばフルオレセイン、チオフラビン、エオシン、ローダミン B 等がある。

【0013】

また、凸部とは凸部間の間隔（中間のスペースの大きさ）が垂直上方から見たときの凸部の外形寸法の 1 倍よりも大きいものを指し、特に凸部間の間隔の平均値が凸部の外形寸法の 2 倍以上 4 倍以下であるものが望ましい。同様に、凹部とは凹部間の間隔（中間のスペースの大きさ）が垂直上方から見たときの凹部の外形寸法の 1 倍よりも大きいものを指し、特に凹部間の間隔の平均値が凹部の外径の 2 倍以上 4 倍以下であるものが望ましい。凸部又は凹部の間隔が外形寸法の 2 倍以上 4 倍以下とすることにより、効率よく局在プラズモン共鳴を発生させることができる。

【0014】

本発明の局在プラズモン共鳴センサでは、検体は発光分子で修飾されているので、分析試料液に特異的な検体が含まれていて特異的な検体が分子認識機能物質に吸着されると、特異的な検体を修飾している発光分子が金属層の近傍に捕捉される。このとき金属層に励

起光を照射すると、金属層の凸部又は凹部で局在プラズモンが励起され、その周囲に強い電界が発生する。そのため、その近傍に発光分子が捕捉されていると発光分子がルミネッセンス光を出す。よって、このルミネッセンス光を観測することにより、分子認識機能物質に吸着されている特異的な検体の有無やその量を計測することができる。

【0015】

また、この局在プラズモン共鳴センサにあっては、捕捉された発光分子の発光を観測するので、強いシグナルを得ることができ、特異的な検体の測定精度を高くすることができる。しかも、透明基板に凸部又は凹部を有する金属層を形成しているため、励起光を照射したとき電界は金属層の凸部又は凹部の周囲の小さな領域に局在しており、均一な厚みの金属薄膜を用いた場合のように200～300nmといった広い範囲（しみ出し距離）に電界が広がることがない。よって、分子認識機能物質に捕捉されていない検体で発光する発光分子が少なくなり、シグナルのノイズを小さくすることができる。この結果、本発明の局在プラズモン共鳴センサにあっては、検体を修飾する発光分子と凸部又は凹部を有する金属層の組み合わせにより、高いS/N比を得ることができて高い測定精度を達成することが可能になる。特に、分子認識機能物質に捕捉されている検体1分子の検出も可能になる。

【0016】

本発明のある実施態様では、前記励起光を前記基板の表面で全反射する入射角でセンサユニットに照射している。励起光を基板表面で全反射させると、全反射される励起光は基板表面から金属層側にしみ出してエバネッセント光となるので、エバネッセント光と金属層の凸部又は凹部とが結合し、励起光と凸部又は凹部との結合効率が向上する。そして、励起光と凸部又は凹部との結合効率が向上することにより、凸部又は凹部の周囲に発生する電界の強度が大きくなる。

【0017】

また、この実施態様においては、前記基板の裏面にプリズムを密着させて配置することが望ましい。プリズムとしては、測定の態様に応じて、三角プリズム、半円形又は半球状のプリズム（ガラスブロック）を用いることができる。基板の裏面にプリズムを密着させて配置することにより、励起光の反射を少なくし、基板へ励起光を効率よく導くことができる。

【0018】

本発明の別な実施態様においては、前記センサユニットの前記金属層及び前記分子認識機能物質を設けられた面に対向する側に、レンズを介して光検出器を配置している。レンズ（例えば、対物レンズ、顕微鏡光学系など）を介して光検出器で発光分子のルミネッセント光を観測することにより、狭い領域の発光を観察することができ、検体1分子程度の分解能を得ることが可能になる。

【0019】

励起光の波長は、発光分子の発光波長と異ならせておくことが望ましい。励起光の波長と発光分子の発光波長とを異ならせておくことにより、励起光と発光分子のルミネッセント光とを容易に分離することができ、測定精度を向上させることができる。その場合、励起光を遮断し発光分子の発光波長の光だけを透過させるカットフィルタを光検出器の前に配置してもよい。このようなカットフィルタを設けることにより、光検出器に励起光が入射するのを防止することができ、測定信号のノイズをさらに減らすことができる。

【0020】

本発明において用いられている凸部を有する金属層は、前記基板の表面に間隔をあけて固定された金属微粒子からなっていることが望ましいが、前記基板表面に形成された金属薄膜の上に間隔をあけて金属微粒子を固定したものでもよい。あるいは、前記基板の表面に間隔をあけて固定された金属微粒子の上から前記基板表面に金属薄膜を形成したものでもよい。また、前記凹部を有する金属層は、前記基板の表面に形成された金属薄膜に間隔をあけて凹部を形成したものである。これらの凸部や凹部は、スタンプにより基板表面に形成された金属薄膜に型押しすることによって形成されていてもよい。

【0021】

また、前記金属層の材料としては、AuまたはAgを用いるのが望ましい。他の金属材料でも差し支えないが、AuやAgを用いれば、可視光領域で効率よく局在プラズモン共鳴を起こさせることができると共に、金属層と分析試料液とが反応しにくく安定性がよい。

【0022】

前記凸部又は凹部の高さ（深さ）及び幅は、いずれも150nm以下とすれば、効率よく局在プラズモン共鳴を発生させることができる。また、前記凸部の形状は、球、楕円球または球もしくは楕円球の一部とすることにより、効率よく局在プラズモン共鳴を発生させることができる。

【0023】

また、本発明のさらに別な実施態様においては、前記基板又は前記金属層の一部領域に親水処理、疎水処理又は帯電処理を施しておき、当該処理を施されていない領域に前記分子認識機能物質を固定したことを特徴としている。プロテイン等の生体分子は親水性、疎水性、帯電性などの性質を有しているので、所定の領域に基板に親水処理、疎水処理、帯電処理などを施しておくことにより、所望の領域に分子認識機能物質として生体分子を配列させることができ、分子認識機能物質の整列化が容易になる。

【0024】

また、分析試料液における前記発光分子のモル濃度が100nM（ $=10^{-7}$ モル／リットル）以上で測定することができるので、生体的な検体濃度で検体の測定を行うことができる。

【0025】

また、局在プラズモン共鳴センサに前記分析試料液を通過させるための流路を設け、前記分子認識機能物質が流路内に面するようにしておけば、分析試料液を分子認識機能物質の固定されている領域へ容易に導入することができる。

【0026】

なお、本発明の以上説明した構成要素は、可能な限り任意に組み合わせることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

以下、本発明の実施形態を図面に従って詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0028】

図4は本発明の一実施形態による局在プラズモン共鳴センサ31の概略構成図であり、図5はその一部を拡大した概略図である。この局在プラズモン共鳴センサ31は、主としてセンサユニット34、光源37及び光検出器41からなる。センサユニット34においては、ガラス基板等の透明な基板32の表面に多数の金属微粒子33が固定されていて、金属層が形成されている。この金属微粒子33は直径数十nm（特に、直径10～30nm）のAu、Ag等のナノレベルの金属粒子であって、ほとんど凝集することなく、互いに離れた状態で固定されている。金属微粒子33の配置は、規則的である必要はなく、ランダムに分散してよい。

【0029】

金属微粒子33は、互いの間隔（中間のスペースの大きさ）が金属微粒子33の直径の2倍以上4倍以下であるものが望ましい。例えば、金属微粒子33の密度は、 $1\mu\text{m}^2$ あたり約370個とすれば、被覆率に換算すると約0.17となる。また、この透明基板32及び金属微粒子33の表面には、分子認識機能物質として所定の種類の受容体35が固定されている。

【0030】

受容体35は透明基板32の一部領域に固定してあってもよく、あるいは、区分的に固定してあってもよい。また、1種類の受容体35を用いていてもよく、2種類以上の受容

体35を区分けして固定していてもよい。透明基板32の一部に受容体35を固定しようとする場合には、受容体35を固定しようとする領域以外の領域に親水処理、疎水処理、帯電処理などの前処理を行っていてもよい。そのための前処理剤としては、例えばシランカップリング剤を用いることができる。前処理を行う方法としては、インクジェット式プリンタによる薬剤塗布、フォトリソグラフィによる被膜形成、レーザー照射や電子ビーム照射等による帯電処理などの方法がある。生体高分子である受容体35は帯電、親水性、疎水性などの性質があるので、受容体35の特性に応じていずれかの前処理を行えば、受容体35を固定しようとする領域以外の領域に受容体35が固定されないようにすることができる。

【0031】

また、透明基板32の裏面には、マッチングオイル等を挟んでプリズム36の上面が密着させられている。図示例では、三角プリズムの上面を透明基板32の裏面に密着させているが、入射光の入射角度を変化させて測定を行う場合には、半円状又は半球状をしたプリズム（ガラスブロック）を透明基板32の裏面に密着させていてもよい。

【0032】

センサユニット34の裏面側には、励起光（後述の発光分子を励起して発光させることのできる波長域の光）を出射させるための光源37と、黒色板等の光吸収板38とが配置されている。光源37としては、半導体レーザー（LD）、発光ダイオード（LED）、ランプ等を利用できる。光源37から出射される光の波長は、発光分子の発光波長と異なった波長領域のものが用いられる。あるいは、フィルタ45を光源37の前面に配置し、フィルタ45により光源37から出射された光のうち発光分子の発光波長域の光を除去してもよい。また、光源25は、その出射光が透明基板32の表面に全反射角よりも大きな入射角で入射するように配置されている。

【0033】

また、金属微粒子33及び受容体35が設けられている透明基板32の表面に対向させて、対物レンズや顕微鏡光学系などのレンズ39、励起光の波長の光を遮断して発光分子の発光波長域の光を透過させるカットフィルタ40、フォトダイオード（PD）やCCD等の光検出器41をこの順序で配置している。

【0034】

透明基板32の表面側には、分析試料液42を導入して分析試料液42が受容体35と接触できるようにしている。分析試料液42を簡単に導入できるようにするためには、図6に示すように、透明基板32の表面側に分析試料液42の流れる流路46を形成するのが望ましい。なお、図6では流路46の上面を覆っているが、流路46の上面は開放されていても差し支えない。分析試料液42は、例えば人や動物などの血液等の体液であって、そこに含まれるリガンドは予め発光分子によって修飾されている。発光分子とは、光又は電磁界を照射されたときに蛍光や燐光等のルミネッセンス光を発生するものであって、例えばフルオレセイン、チオフラビン、エオシン、ローダミンB等がある。

【0035】

しかして、この局在プラズモン共鳴センサ31にあっては、リガンドを含んだ分析試料液42が透明基板32の表面側に導入されると、分析試料液42が受容体35に触れる。図5に示すように、透明基板32の表面側に導入された分析試料液42中に受容体35と結合する特異的なリガンド43が含まれていると、特異的なリガンド43の一部は受容体35に吸着される。また、特異的でないリガンド44が分析試料液42に含まれていても、このリガンド44は受容体35に吸着されることなく、分析試料液42中に分散している。

【0036】

図4に示すように、光源37から出射された励起光は、プリズム36の斜面に入射し、プリズム36及び透明基板32を透過して透明基板32の表面で全反射し、再び透明基板32及びプリズム36を透過してプリズム36の斜面から外部へ出射される。プリズム36から出た励起光は、散乱してノイズとならないよう光吸収板38によって吸収される。

【0037】

このとき励起光が透明基板32の表面で全反射することにより透明基板32の表面にはエバネッセント光が発生しており、エバネッセント光と各金属微粒子33とが局在プラズモン共鳴し、金属微粒子33の周囲には強い局所的な電界が生成される。このような局在プラズモン共鳴によれば、金属微粒子33の周囲に発生する電界は、金属微粒子33のサイズ程度の領域に閉じ込められている。分析試料液42に特異的なリガンド43が含まれていて受容体35に特異的なリガンド43が吸着されていると、そのリガンド43を修飾している発光分子が金属微粒子33の局所的な電界領域内にあり、発光分子からルミネッセンス光が発生する。

【0038】

従って、対物レンズ等のレンズ39を通して発光分子から発光するルミネッセンス光を観察することにより、分析試料液42に特異的なリガンド43が含まれているか否かを判定することができる。また、発光分子の発光強度を測定することにより、あるいは、発光分子による輝点を数えることにより、受容体35に吸着されている特異的なリガンド43の量や濃度等を計測することができる。

【0039】

図7及び図8は透明基板12の表面に金属薄膜13を形成している場合と本実施形態による局在プラズモン共鳴センサ31との作用を比較して示す図である。図7は透明基板12の表面に均一な厚みの金属薄膜13を形成している場合（1番目の従来例）の電界の広がりを表しており、図8（a）（b）（c）は透明基板32の表面に金属微粒子33が固定されている場合（本実施形態）の電界の分布を説明している。よく知られているように、金属薄膜13の場合には、図7に示すようにエバネッセント光によって励起された表面プラズモンの電界は、指数関数的に減衰しながら、透明基板12の表面から200～300nm（しみ出し距離）くらいまで広がっている。そのため、受容体14に吸着されていないリガンドにまで金属薄膜13の電界が届き、図7でドットを施したリガンド15のように受容体14から比較的遠くの距離にあるリガンド15を修飾する発光分子までが発光してノイズとなり、測定精度を低下させる。

【0040】

これに対し、本実施形態のように金属微粒子33を透明基板32の表面に形成している場合には、原理的には、図8（a）に示すように金属微粒子33の位置でのみ強い電界が発生する。しかし、この電界は図8（b）に示すように平均化されるので、金属微粒子33の位置における電界が弱くなる。特に、金属微粒子33の場合には、図8（c）に示すように電界は金属微粒子33の近傍に閉じ込められる。金属微粒子に光を垂直に照射した際の局在プラズモン共鳴に関する研究によれば、この電界は金属微粒子のサイズ程度の領域に閉じ込められることが知られている。よって、図8（c）においてドットを施したリガンド43を修飾する発光分子のように、受容体35に吸着された特異的なリガンド43を修飾している発光分子は、この局所電界により発光させられる。しかし、受容体35に吸着されていない特異的なリガンド43や非特異的なリガンド44は発光せず、ノイズが発生しにくいために受容体35に吸着されている特異的なリガンド43の有無又はその量を精度良く測定することができる。

【0041】

また、従来の局在プラズモン共鳴（2番目の従来例参照）では、光を金属微粒子に垂直に照射して光（進行波）と金属微粒子とを直接に局在プラズモン共鳴させていたが、このような局在プラズモン共鳴の方法では、金属微粒子の断面積と等しい光束断面の光しか金属微粒子とカップリングできず、光と金属微粒子との結合効率が低い。そこで、本実施形態では、エバネッセント光と金属微粒子とをカップリングさせて局在プラズモン共鳴させることにより、光と金属微粒子との結合効率を向上させている点も本実施例の特徴である。

【0042】

本実施形態では、透明基板32に斜め方向から励起光を照射して透明基板22の表面で

励起光を全反射させている。このように光を界面で全反射させる場合、図 9 に示すように、界面における入射点と反射光の出射点との間には飛びが発生する。この現象は、グースヘンシェン効果として知られており（例えば、ジャクソン電磁気学第 3 版（上巻）、吉岡書店、P. 4 2 6 ~ 4 2 9）、この飛びはグースヘンシェンシフトと言われる。このとき、図 9 に破線で示すように、界面で全反射する光は界面よりも外に染み出して界面近傍に閉じ込められており、これがエバネッセント光である。

【0043】

本実施形態のように、金属微粒子 33 を固定された透明基板 32 に対して斜め方向から光を照射して全反射させた場合には、図 10 に示すように、透明基板 32 から金属微粒子 33 側に向かう励起光が金属微粒子 33 を励起すると共に、金属微粒子 33 側から透明基板 32 へ戻る励起光も金属微粒子 33 を励起することになり、金属微粒子 33 と励起光との結合効率は垂直照射の場合よりも向上する。

【0044】

これは次のように異なる説明の仕方をすることもできる。図 9 に示されているように、エバネッセント光は界面の近傍で界面と平行に移動している。したがって、金属微粒子の断面よりも大きな光束断面の光が界面に斜め入射して全反射しているとすると、この大きな光束断面の光は、エバネッセント光として界面近傍に閉じ込められて界面と平行に移動している。このエバネッセント光が金属微粒子に当たってカップリングすれば、実効的には金属微粒子の断面よりも大きな光束断面の光が金属微粒子にカップリングしていることになり、光と金属微粒子との結合効率が大きくなる。

【0045】

よって、本実施形態によれば、金属微粒子 33 と励起光との結合効率を高めることで、金属微粒子 33 の近傍により強い電界を発生させることが可能になり、発光分子をより強く発光させることができ、シグナルの S/N 比をより向上させることができる。

【0046】

ただし、グースヘンシェンシフトが大きくなると、光と金属微粒子との結合は大きくなるが、エバネッセント光のしみ出し距離が大きくなるので、励起光の波長や透明基板 32 の屈折率など望ましい条件が存在するが、これらは実験的に決めることができる。

【0047】

図 11 ~ 図 12 は、透明基板に垂直な断面において、透明基板の界面で光が全反射するときの様子をシミュレーションした結果を表しており、濃淡の度合いが電界の強さを表している。図 11 は屈折率 1.732 のガラス基板（透明基板）の表面に水（屈折率 1.33）を接触させただけで、金属薄膜も金属微粒子も設けられていないときのシミュレーションを表している。この場合には、反射波の電界強度が比較的高く、エバネッセント光は 600 nm 程度しみ出している。図 12 は屈折率 1.732 ガラス基板の表面に厚さ 50 nm の Au 薄膜（金属薄膜）を形成し、その上に水を接触させたときのシミュレーションを表している。この場合には、金属薄膜を設けていない場合とほとんど変わりがなく、エバネッセント光は 200 ~ 300 nm 程度しみ出している。図 13 は屈折率 1.732 のガラス基板（透明基板）の表面に直径 600 nm の Ag 微粒子を 180 nm の間隔をあけて配置し、表面に水を接触させたときのシミュレーションを表している。この場合には、光が Ag 微粒子に吸収されて反射光の電界強度が弱くなっており、電界も Ag 微粒子の近傍に閉じ込められている。また、Ag 微粒子の近傍の電界は、金属微粒子も金属薄膜もない場合と比較して 10 倍以上に大きくなっている。よって、このシミュレーションによれば、金属微粒子にエバネッセント光を作用させることにより、金属薄膜よりも狭い領域に電界を閉じ込めると共に大きな電界強度を得ることができることが分かる。

【0048】

また、図 14 は、図 13 のシミュレーションと同じ条件において、ガラス基板の表面に金属微粒子の直径の 3 倍の間隔をあけて 25 % の被覆率で Ag 微粒子を形成したものについて、入射光の波長 λ と界面における反射率との関係性を求めたシミュレーション結果を示している。また、図 14 では金属微粒子の上から基板上に厚さ 20 ~ 30 nm、屈折率 1

・42の誘電体膜を形成した場合と、誘電体膜を形成していない場合とを示しており、誘電体が付着して屈折率が高くなると反射率が高くなることが分かる。また、このシミュレーションによれば、80～85%程度の光吸収率（反射率15～20%程度）となっており（回折等の影響を含む。）、光と金属微粒子の結合が高くなっていることが分かる。

【0049】

図15は励起光の照射体積と、発光分子のモル濃度と、1分子検出可能なリガンド濃度との関係を表した図であって、横軸が励起光の照射体積 $[fL=10^{-15}$ リットル]を示し、縦軸が発光分子のモル濃度 $[nM=ナノモル/リットル]$ を示している。ここで、照射体積とは、図16に示すように、底面が所定の単位面積で高さが電界の及ぶ距離（しみ出し距離）である立体の体積であって、この照射体積の立体内にある発光分子は励起発光させられる。図15において、直線L1よりも上方の領域は体液等に含まれる生理的なリガンド濃度の領域を示し、直線L2よりも左下方の領域は1分子のリガンドを検出可能な領域を表している。したがって、体液等の生理的なリガンド濃度の分析試料液を対象として、1分子のリガンドを検出可能とするためには、図15における直線L1よりも上方にあり、かつ、直線L2の左下方に位置する三角形の領域で測定を行う必要がある。

【0050】

ここで、共焦点の顕微鏡では励起光の照射体積は、約0.2 fLであり、また、金属薄膜の上に受容体を設けたものでは、照射体積は約0.08 fLである。よって、これらの照射体積を示す垂直線上には、生理的なリガンド濃度で1分子を検出可能な領域は存在しない。これに対し、透明基板32の上に金属微粒子33と受容体35を固定した本発明実施形態の局在プラズモン共鳴センサ31では、励起光の照射体積は約0.008 fLとなるので、図15の領域ARのあたりでは、生理的なリガンド濃度の分析試料液を対象として1分子のリガンドを検出することができる。

【0051】

上記実施形態では、金属層の凸部として球形の金属微粒子33を用いたが、金属微粒子33としては楕円形のものであってもよい。あるいは、図17（a）に示すような球又は楕円の一部を金属微粒子33としてもよい。

【0052】

また、上記実施形態では、透明基板32の上に直接金属微粒子33を形成していたが、図17（b）に示すように、透明基板32の上に金属薄膜47を形成し、金属薄膜47の上に金属微粒子33を設けてもよい。あるいは、図18（a）に示すように、透明基板32の上に金属微粒子33を固定し、金属微粒子33の上から透明基板32の表面を金属薄膜47で被覆してもよい。

【0053】

また、図18（b）に示す変形例では、透明基板32の表面に形成した金属薄膜47に部分的に窪みを形成して金属層の凹部48としている。あるいは、図19（a）に示すように、透明基板32の表面に突起部49を設けておき、その表面を金属薄膜47で覆うことによって金属層の凸部50を形成してもよく、図19（b）に示すように、透明基板32の表面に窪み部51を設けておき、その表面を金属薄膜47で覆うことによって金属層の凹部48を形成してもよい。もっとも、凸部間や凹部間がつながっていると、容易に予測されるように、孤立した金属微粒子の場合に比べて効率は低下する。

【0054】

上記のような種々の凸部や凹部、突起部49、窪み部51などを成形するためには、スタンプを用いた型押しによって行うことができる。例えば、図20（a）～（d）は、図18（b）のような凹部48をスタンプにより成形する場合を説明している。まず、透明基板32の表面に金属薄膜47を堆積させた（図20（a））後、金属薄膜47の上からスタンプ52で押さえる（図20（b））。スタンプ52の下面には、成形用突部53が設けられているので、スタンプ52で金属薄膜47を押すと、金属薄膜47の表面には成形用突部53によって凹部48が転写される（図20（c））。ついで、スタンプ52を離型すると、金属薄膜47の表面にはナノスケールの凹部48が成形される。

【0055】

次に、本発明の局在プラズモン共鳴センサを用いた検査装置58の構成を図21に示す。局在プラズモン共鳴センサ31については、既に説明した。流路制御部54は、センサユニット34の流路に供給する分析試料液の供給速度を調整し、均一な速度で分析試料液が流れるように制御する。データ処理部55は、光検出器41で取得した測定データを、判定処理部56において取り扱うことのできるデータ形式に変換して判定処理部56へ送り出す。判定処理部56は、ハードディスク等の記憶装置57から格納されている判定用データを読み出し、データ処理部55から受け取った処理データと判定用データとを比較し、所定のアルゴリズムに従って分析試料液中の特異性のリガンドの有無やリガンドの濃度等を分析する。データ処理部55の出力データや判定処理部56の判定結果は、出力端末などへ出力される。

【0056】

このような検査装置58を用いてセンサユニット34からのルミネッセント光を測定すれば、分析試料液中のリガンドの有無、量、分子間相互作用、結合力、平衡定数を評価することができる。例えば、プローブDNAが高密度に固定された透明基板上に、蛍光色素等で標識されたサンプルDNAを流すと、互いに相補的なDNAは結合する。よって、透明基板上の各位置での信号を検出すれば、各プローブDNAとサンプルDNAとの相互作用の有無、または程度を評価することができる。この方法を用いれば、遺伝子配列の決定、特定遺伝子の有無の確認、特定遺伝子の発現レベルの測定などが可能である。

【0057】

本発明による局在プラズモン共鳴センサや検査装置の他の用途としては、SNP（単一性塩基多型）の解析、実験用マウスに投与した物質の代謝、吸収、排泄の経路または状態の確認、細胞内のイオン濃度測定、タンパク質の同定または機能解析などが挙げられる。また、本発明による分析方法は、個人の健康状態を判別する健康診断や個人セキュリティのための検査などにも利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】従来の全反射蛍光照明センサを示す概略図である。

【図2】従来の局在プラズモン共鳴センサを示す概略図である。

【図3】図2の局在プラズモンセンサにおいて、透明基板の金属微粒子表面に固定された受容体にリガンドが吸着されている様子を示す図である。

【図4】本発明の一実施形態による局在プラズモン共鳴センサの概略構成図である。

【図5】図4の一部を拡大した概略図である。

【図6】本発明の局在プラズモンセンサの変形例を示す概略構成図である。

【図7】透明基板の表面に金属薄膜を形成している場合において、強い電界の生成する範囲を示す図である。

【図8】(a)(b)(c)は図4の局在プラズモン共鳴センサにおいて、強い電界の生成する範囲を説明するための図である。

【図9】ゲースヘンシェン効果を説明する図である。

【図10】エバネッセント光と金属微粒子との結合を説明する図である。

【図11】透明基板の界面で光が全反射するときの電界の分布を表わした図である。

【図12】表面に金属薄膜を形成された透明基板の界面で光が全反射するときの電界の分布を表わした図である。

【図13】表面に金属微粒子を形成された透明基板の界面で光が全反射するときの電界の分布を表わした図である。

【図14】透明基板の上に金属微粒子を設けた図4のような局在プラズモン共鳴センサにおいて、入射光の波長 λ と界面における反射率との関係を表した図である。

【図15】励起光の照射体積と、発光分子のモル濃度と、1分子検出可能なリガンド濃度との関係を表した図である。

【図16】照射体積の意味を説明する図である。

【図 17】（a）は金属微粒子の別な形状を表した図である。（b）は金属薄膜の上に金属微粒子を形成した凸部を示す図である。

【図 18】（a）は透明基板上の金属微粒子を金属薄膜で被覆して凸部を形成した図である。（b）は金属薄膜に凹部を形成した図である。

【図 19】（a）は突起部を形成された透明基板の表面を金属薄膜で覆って凸部を形成した図である。（b）は窪み部を形成された透明基板の表面を金属薄膜で覆って凹部を形成した図である。

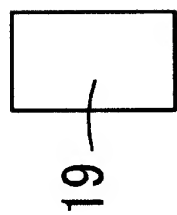
【図 20】（a）～（d）は凹部をスタンプにより成形する工程を表した概略図である。

【図 21】本発明の局在プラズモン共鳴センサを用いた検査装置の構成を示すブロック図である。

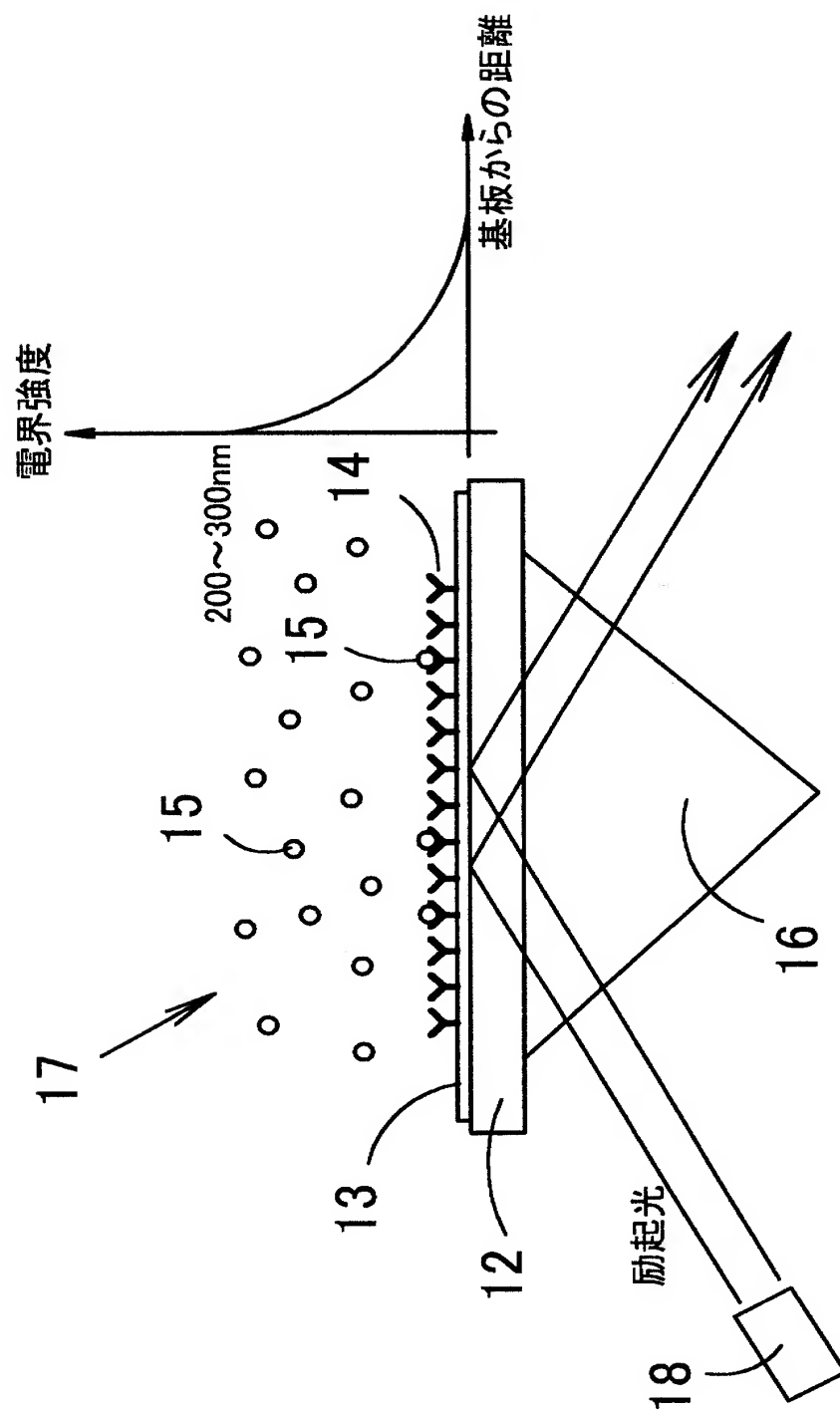
【符号の説明】

【0059】

- 3 1 局在プラズモン共鳴センサ
- 3 2 透明基板
- 3 3 金属微粒子
- 3 4 センサユニット
- 3 5 受容体
- 3 6 プリズム
- 3 7 光源
- 3 8 光吸収板
- 3 9 レンズ
- 4 0 カットフィルタ
- 4 1 光検出器
- 4 2 分析試料液
- 4 3 特異的なリガンド
- 4 5 フィルタ
- 4 6 流路
- 4 7 金属薄膜
- 4 8 凹部
- 5 0 凸部
- 5 2 スタンプ
- 5 8 検査装置



二



基板からの距離

200~300nm

励起光

17

51

•

13

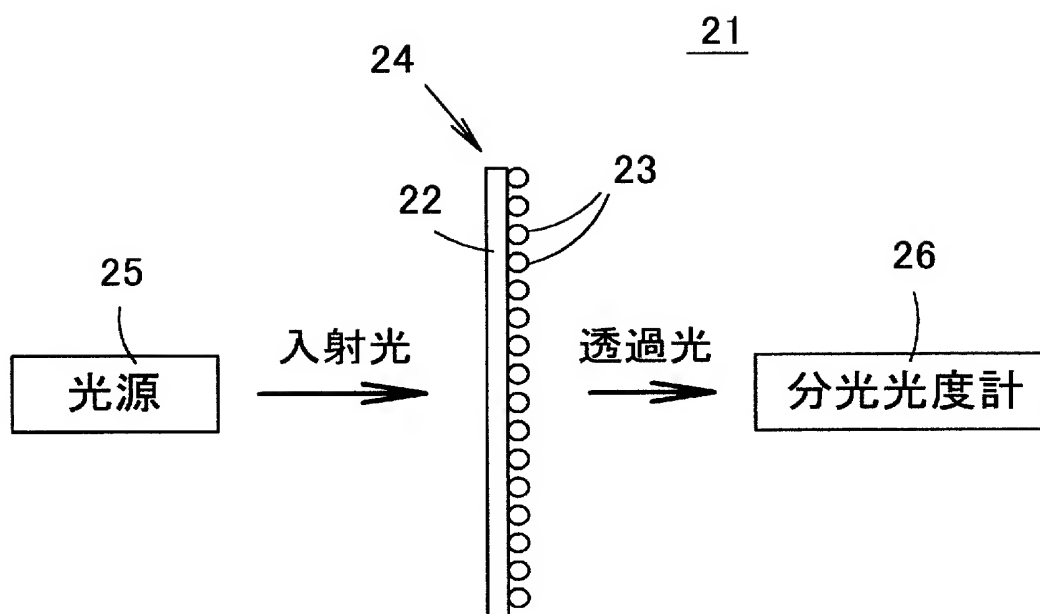
12

16

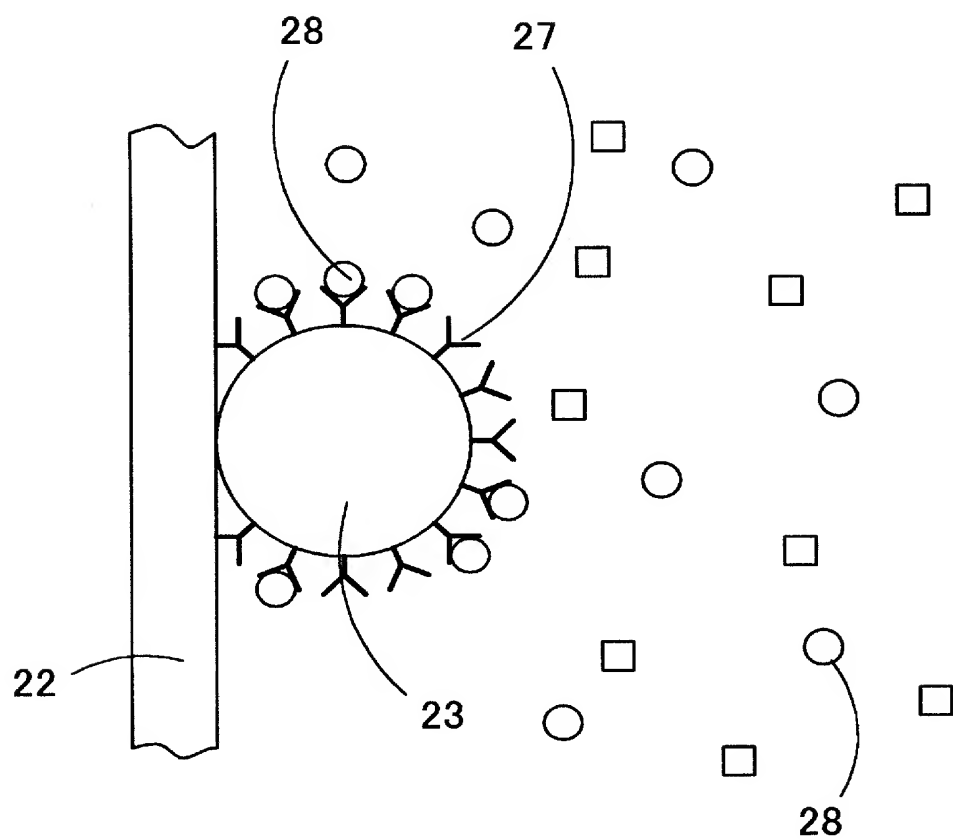
 ∞

14

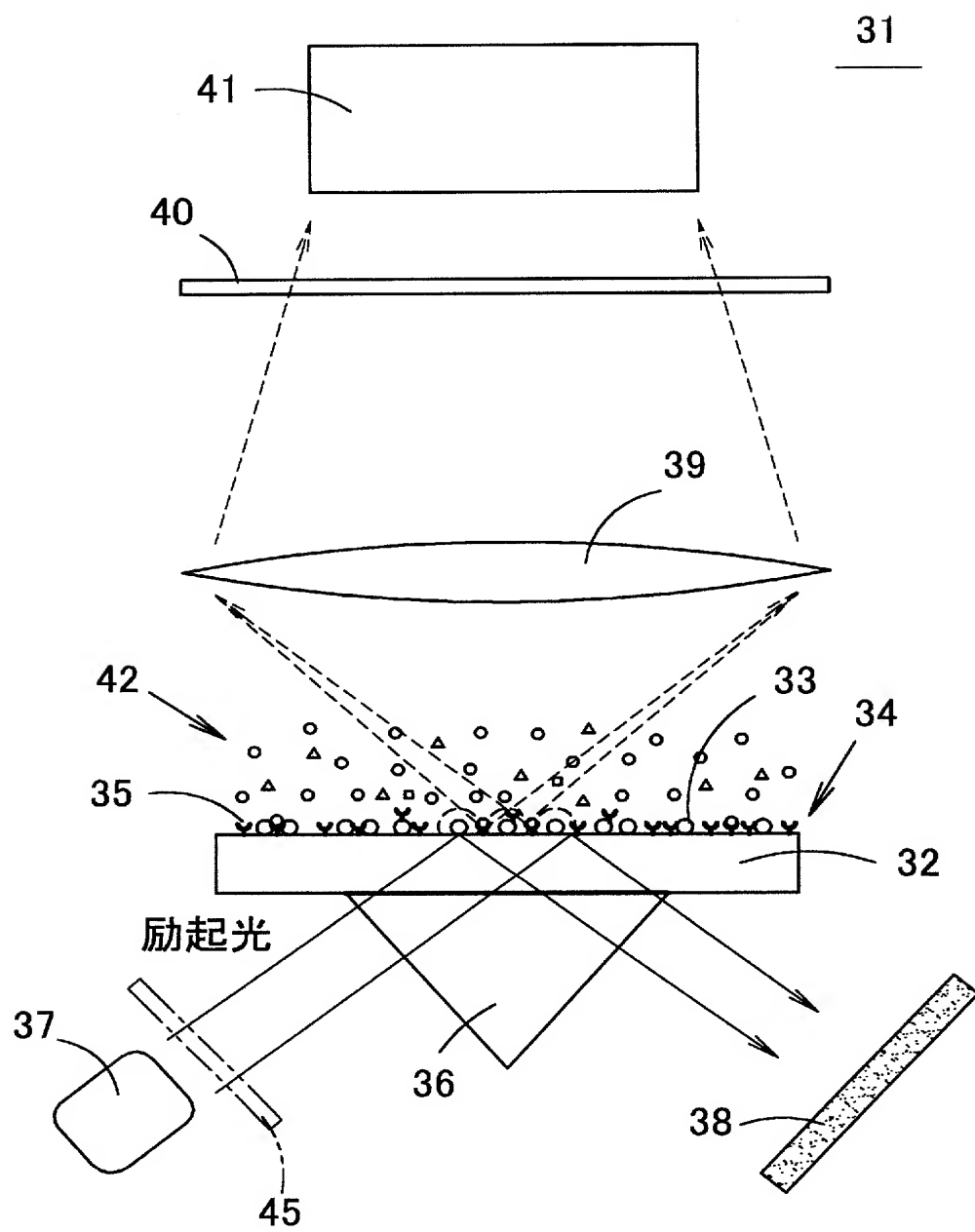
【圖 2】



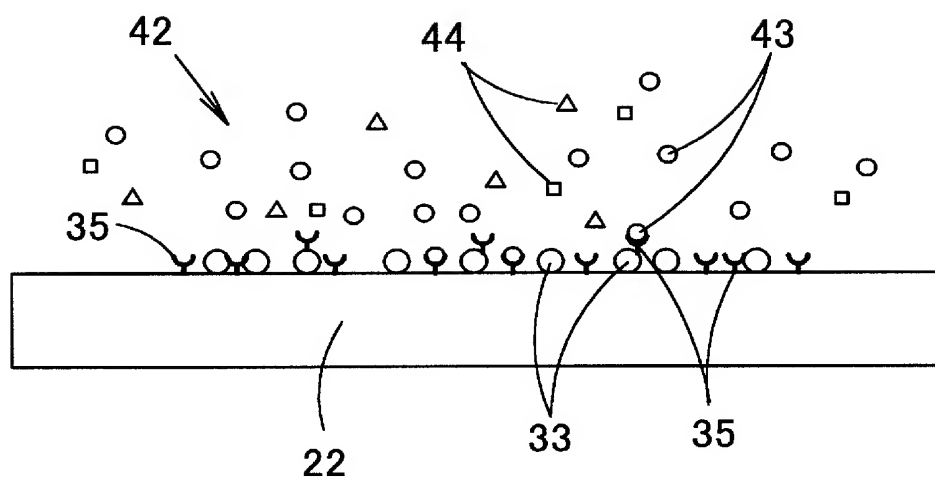
【圖 3】



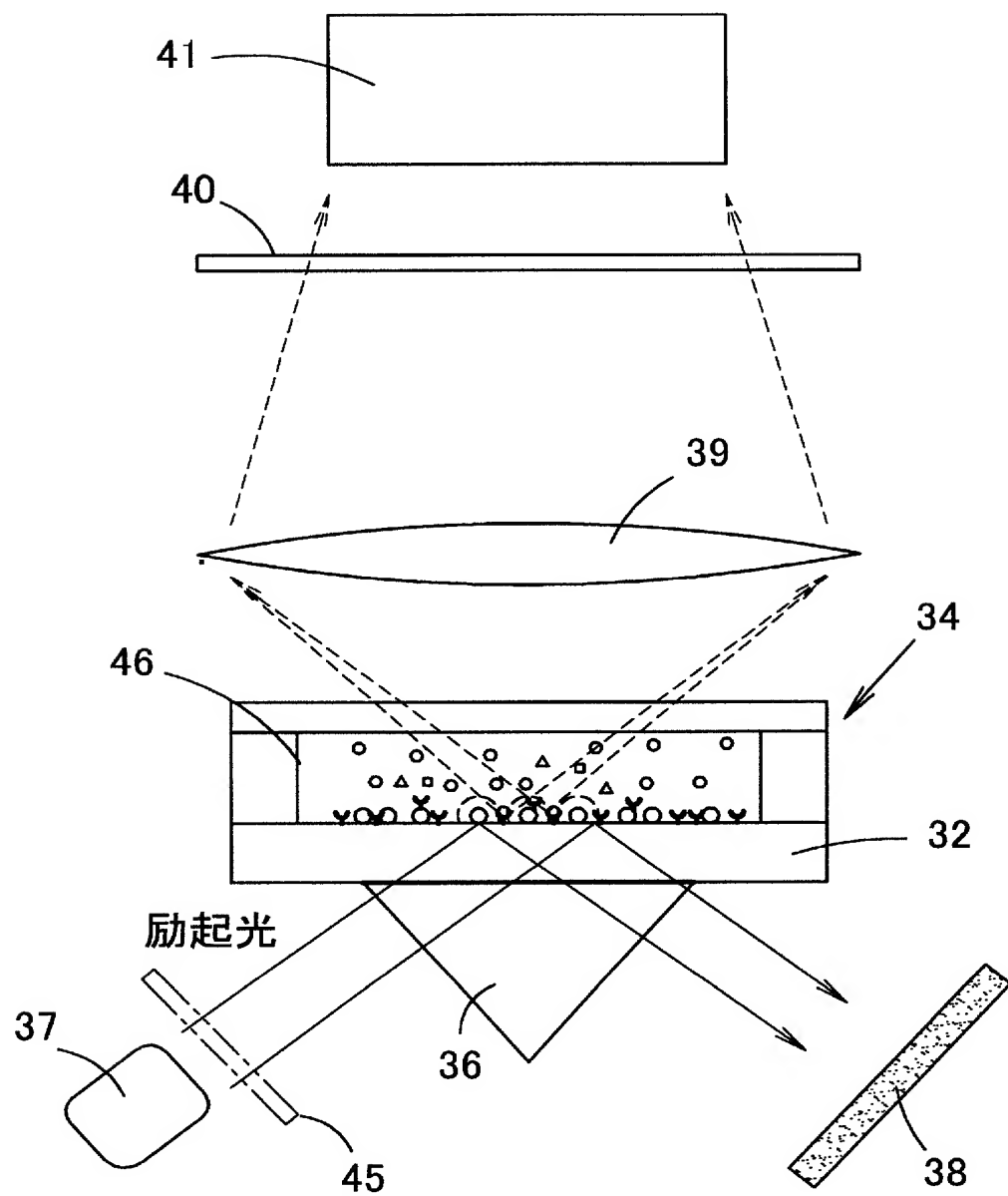
【 図 4 】



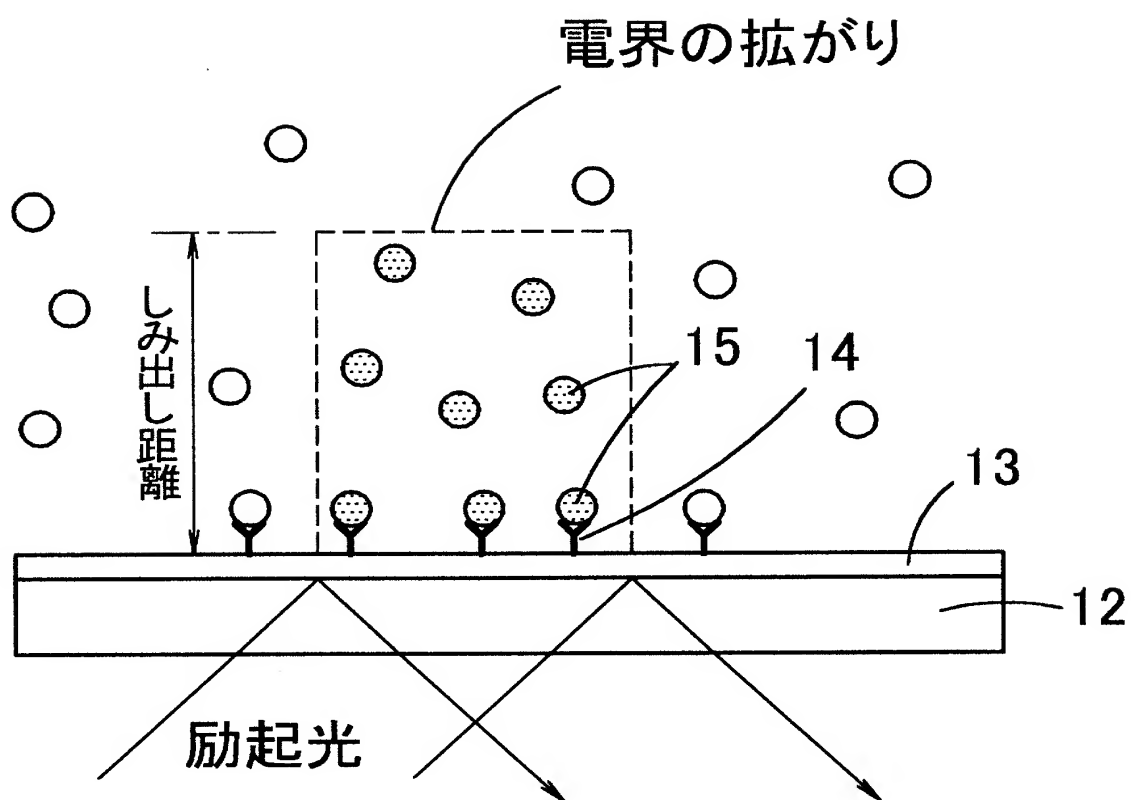
【 図 5 】



【 図 6 】

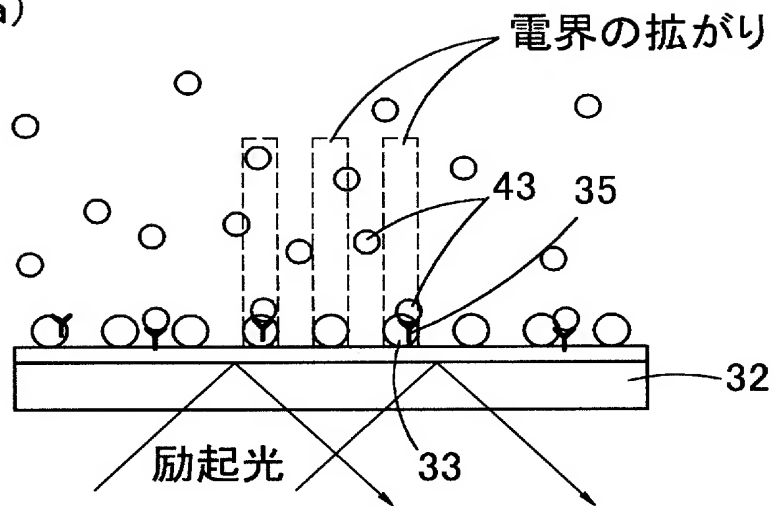


【図 7】

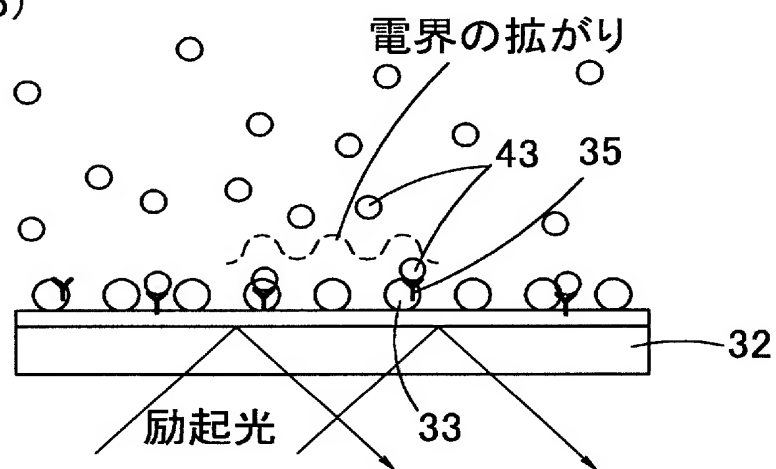


【図 8】

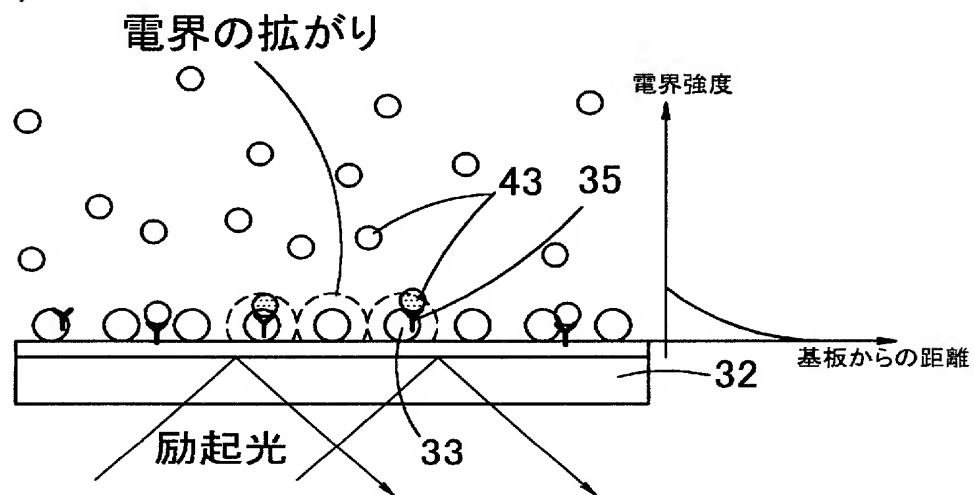
(a)



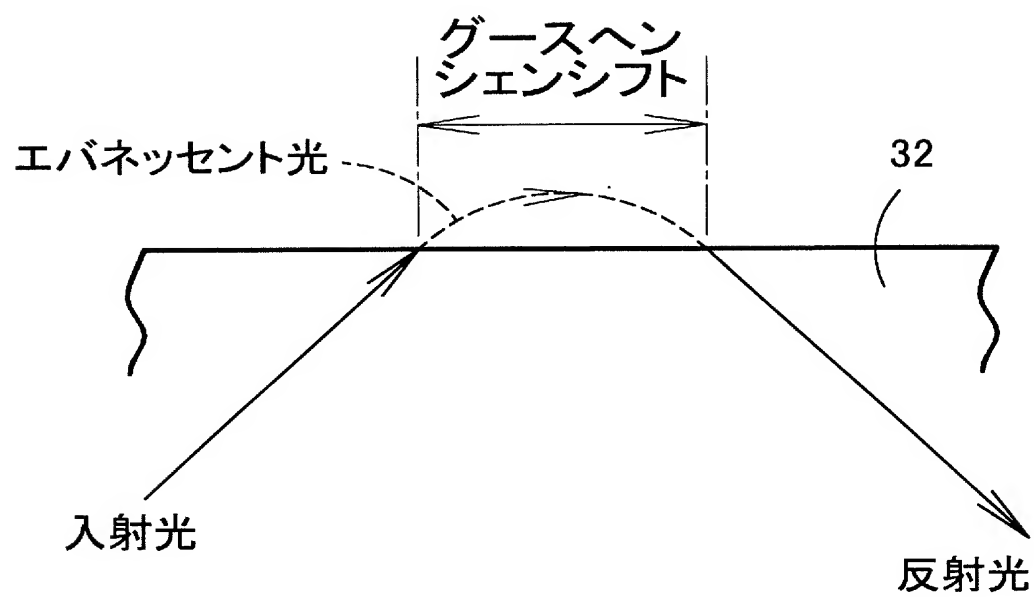
(b)



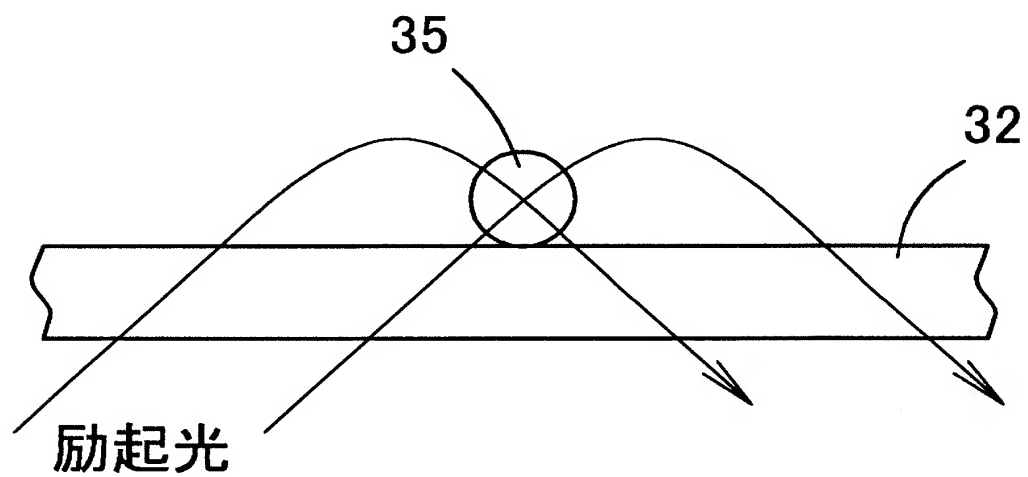
(c)



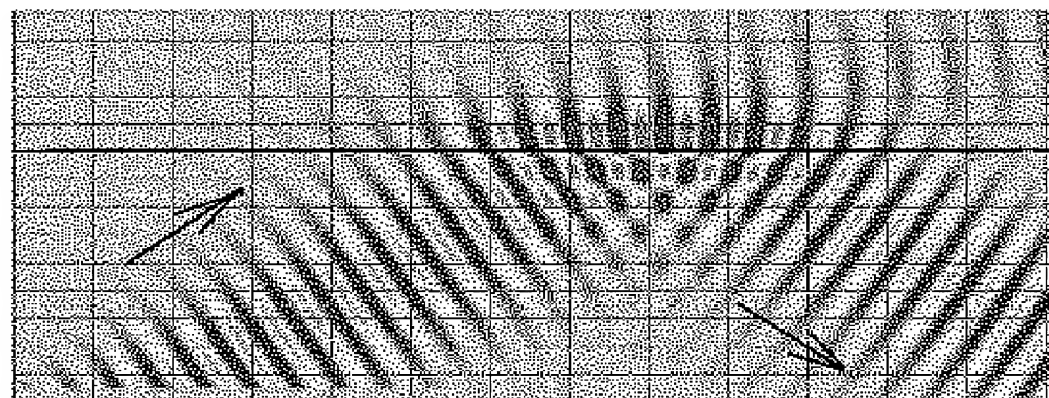
【図 9】



【図 10】

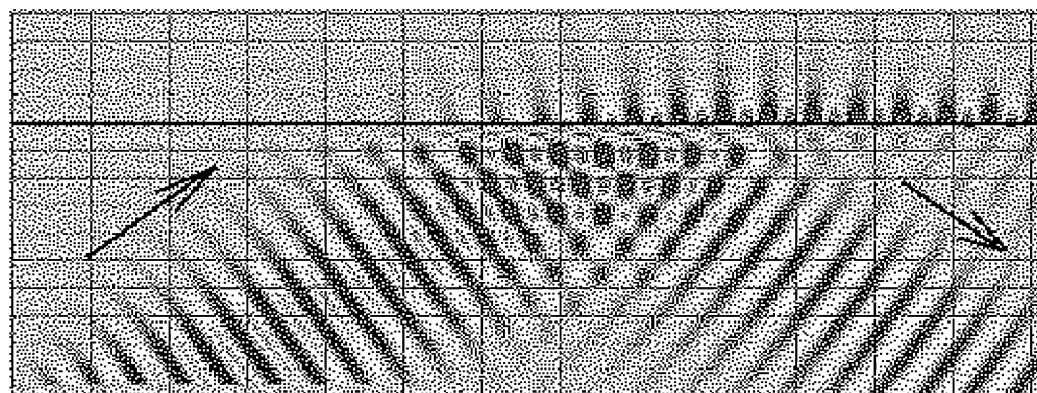


【图 1 1】



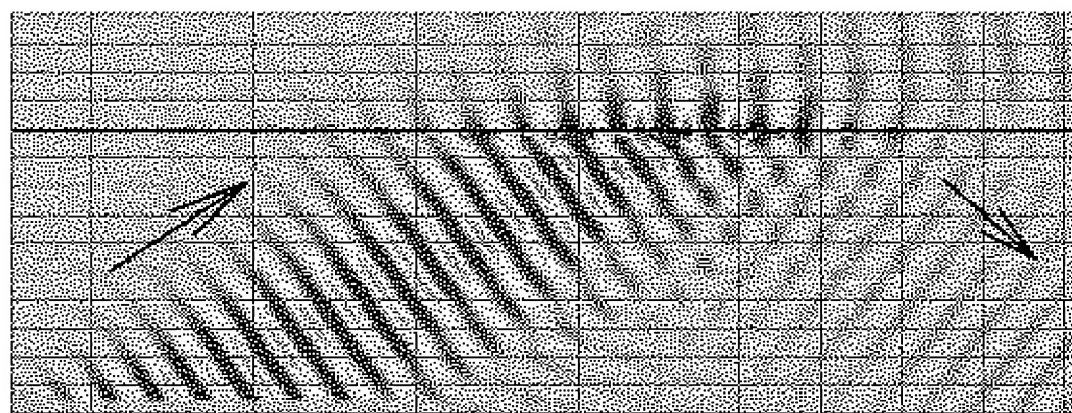
境界面

【图 1 2】



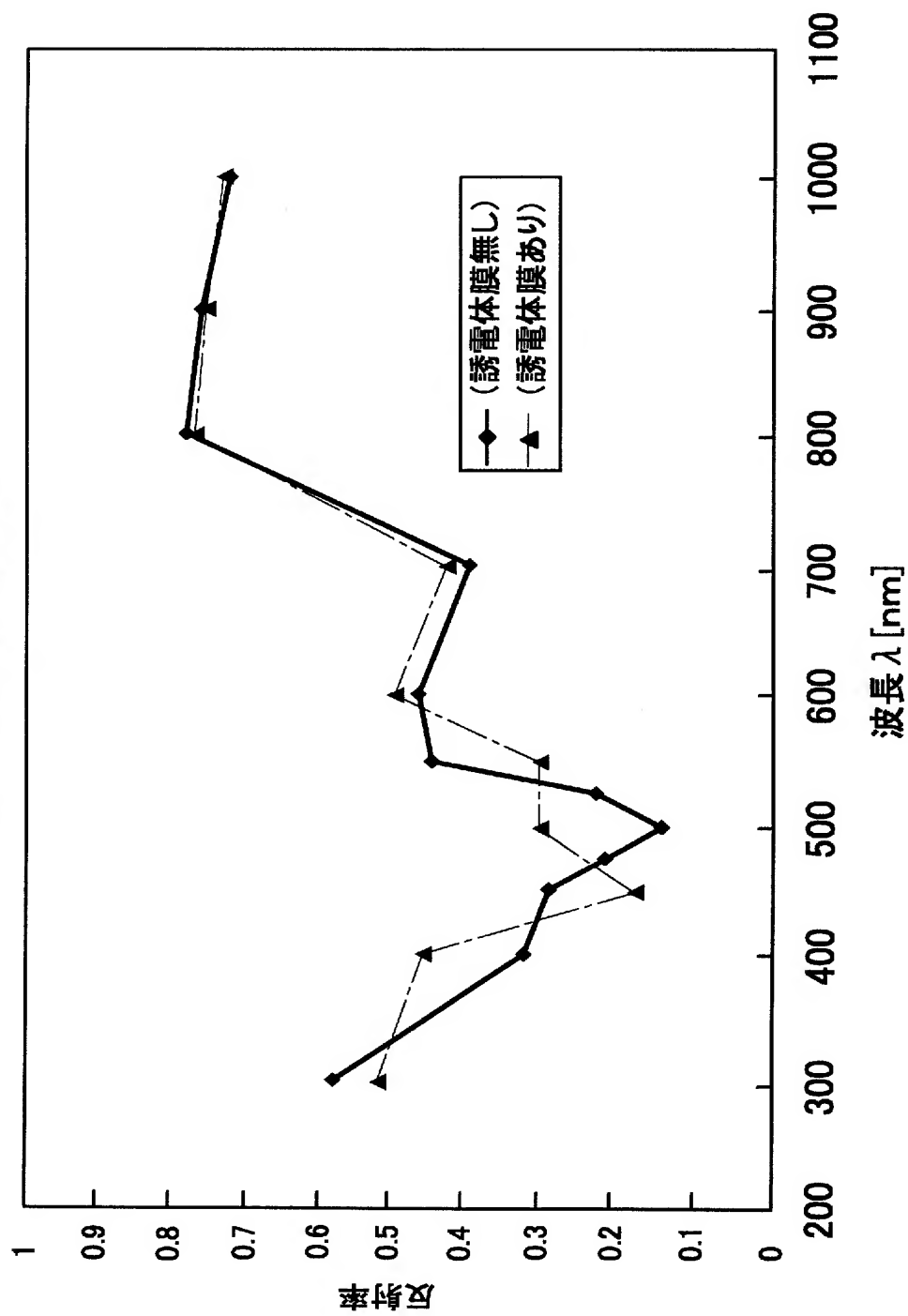
境界面
(金属薄膜)

【图 1 3】

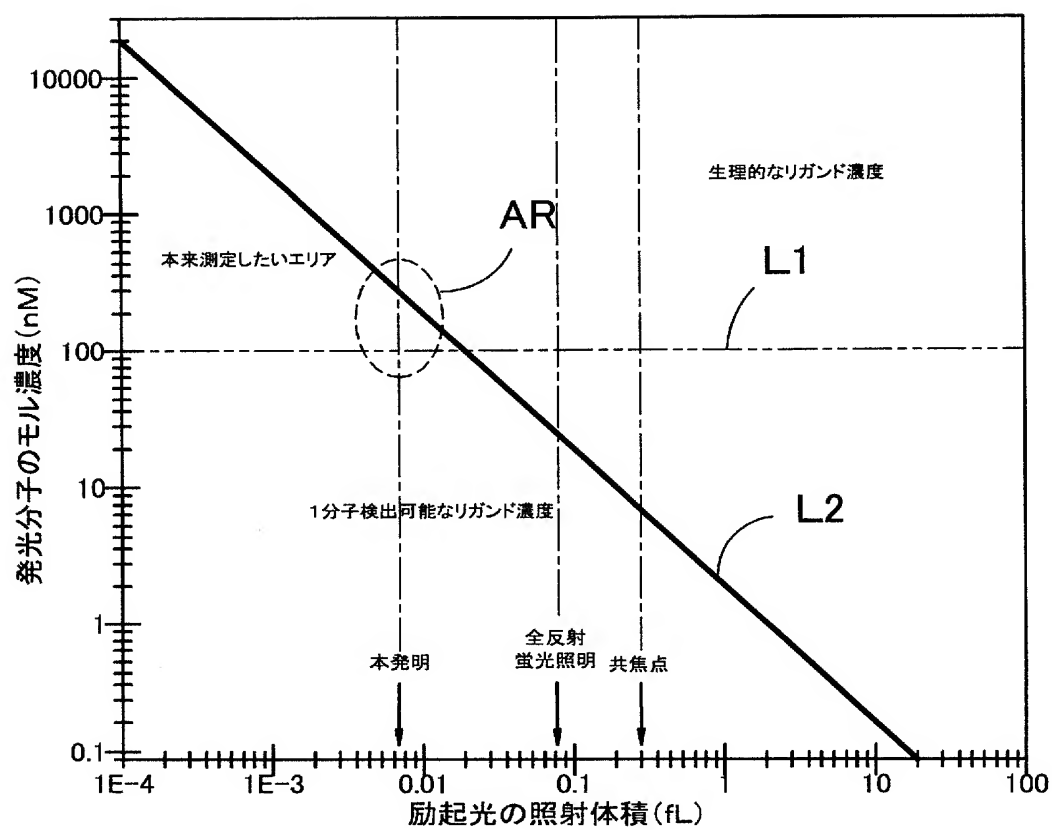


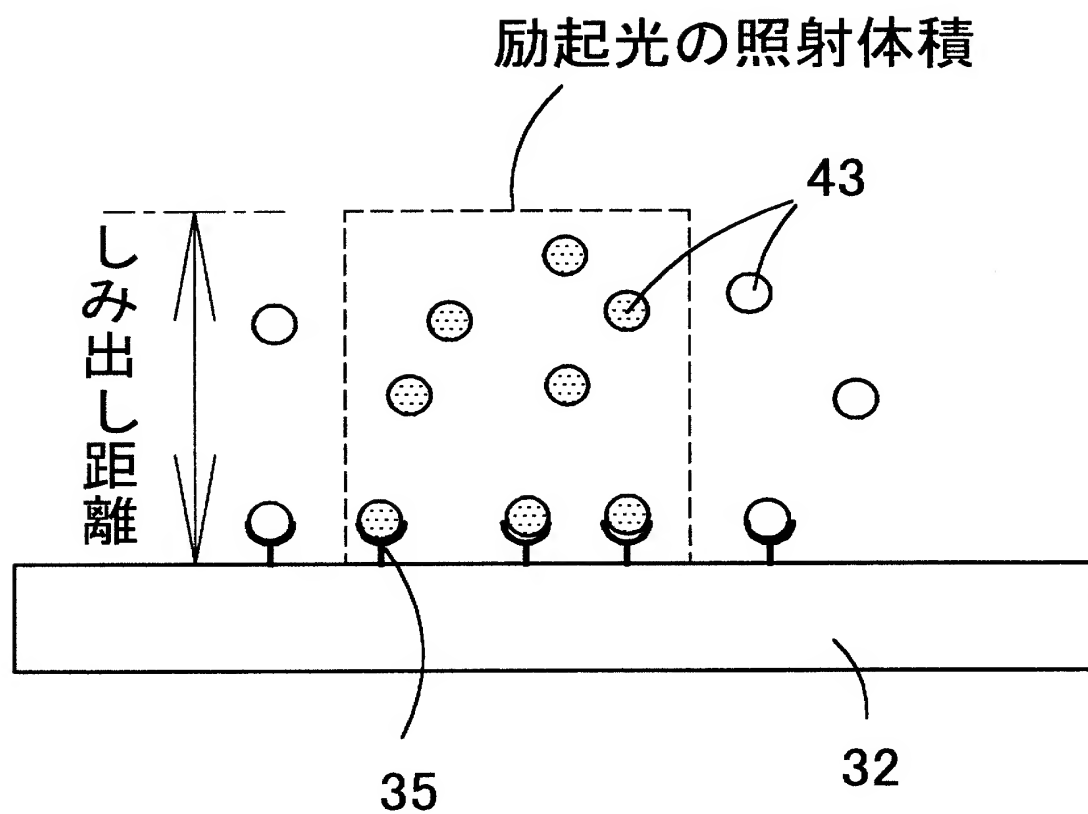
境界面
(金属
微粒子)

球型 超低密度(三箇間隔)

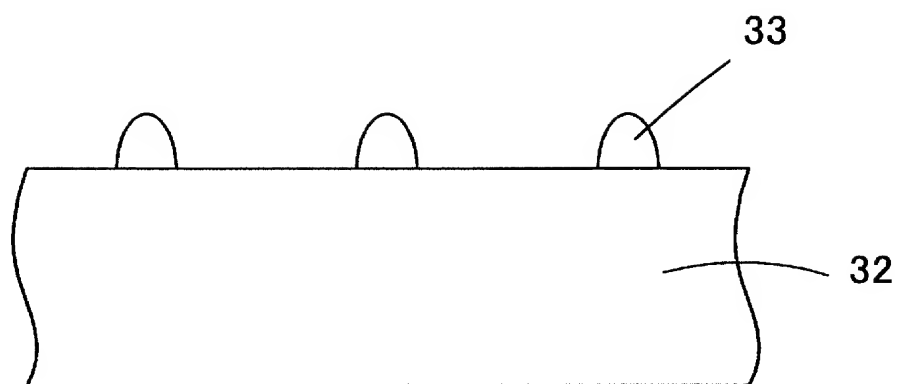


【図 1 5】

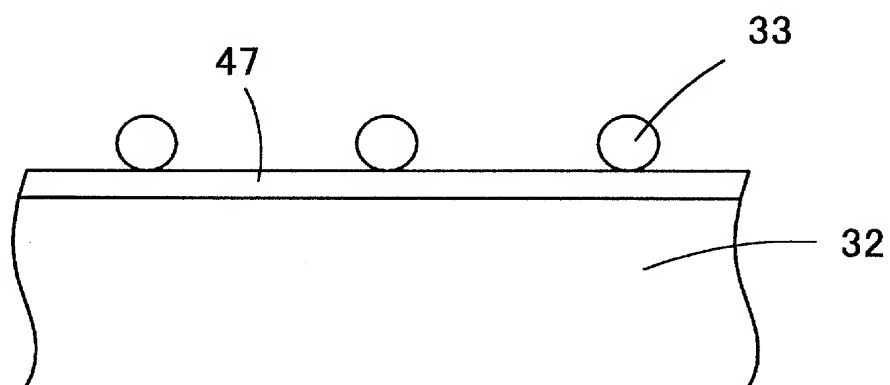




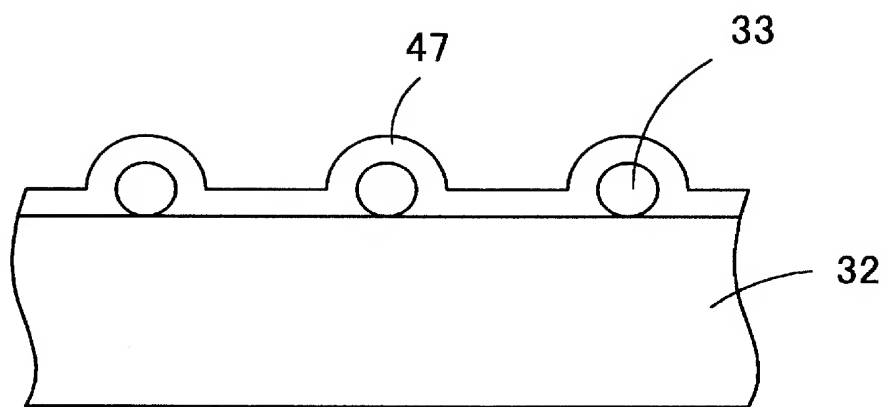
(a)



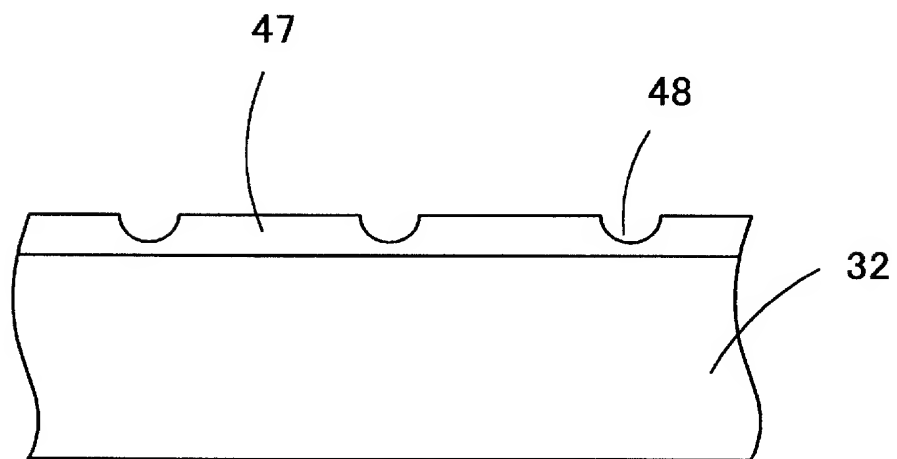
(b)



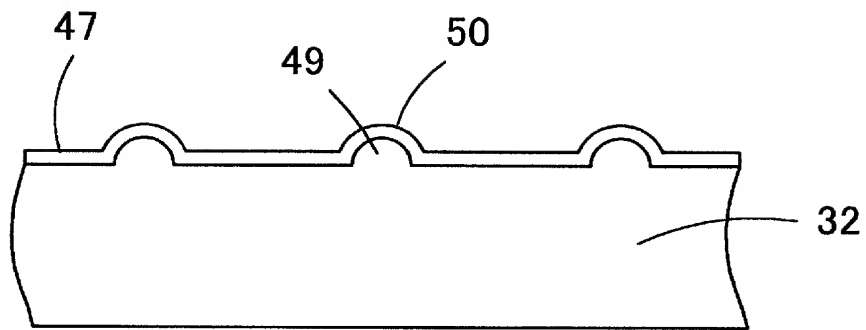
(a)



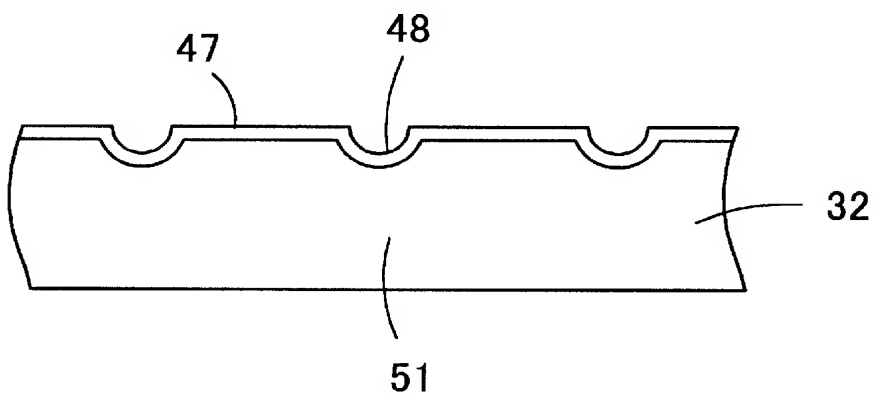
(b)

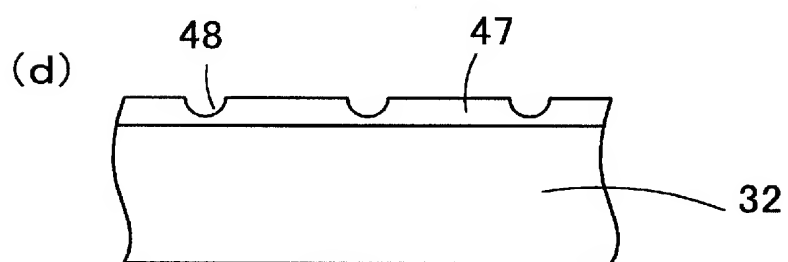
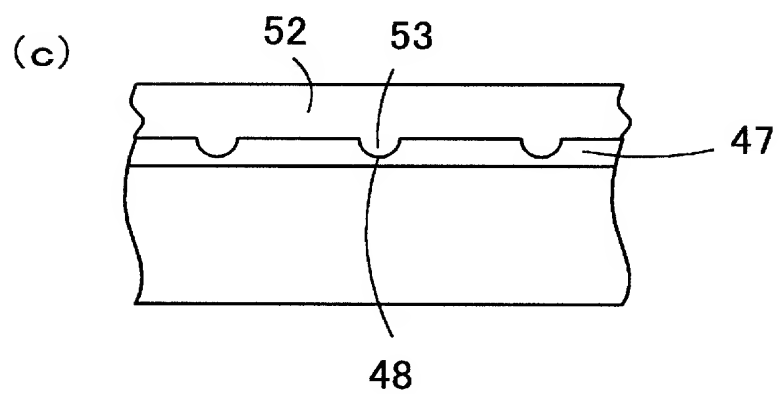
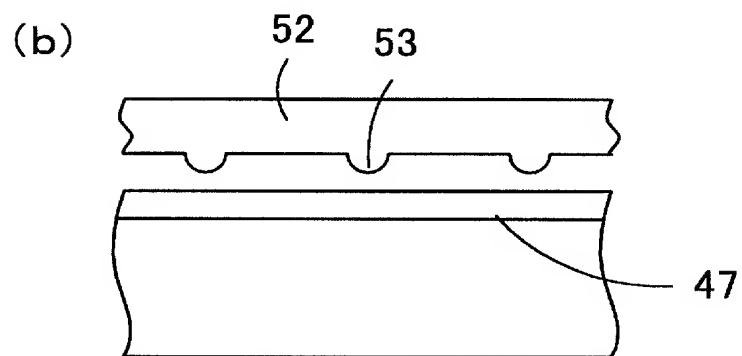
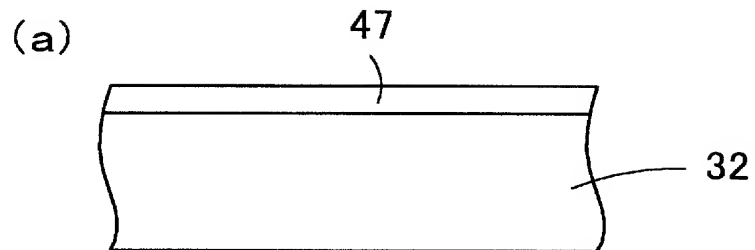


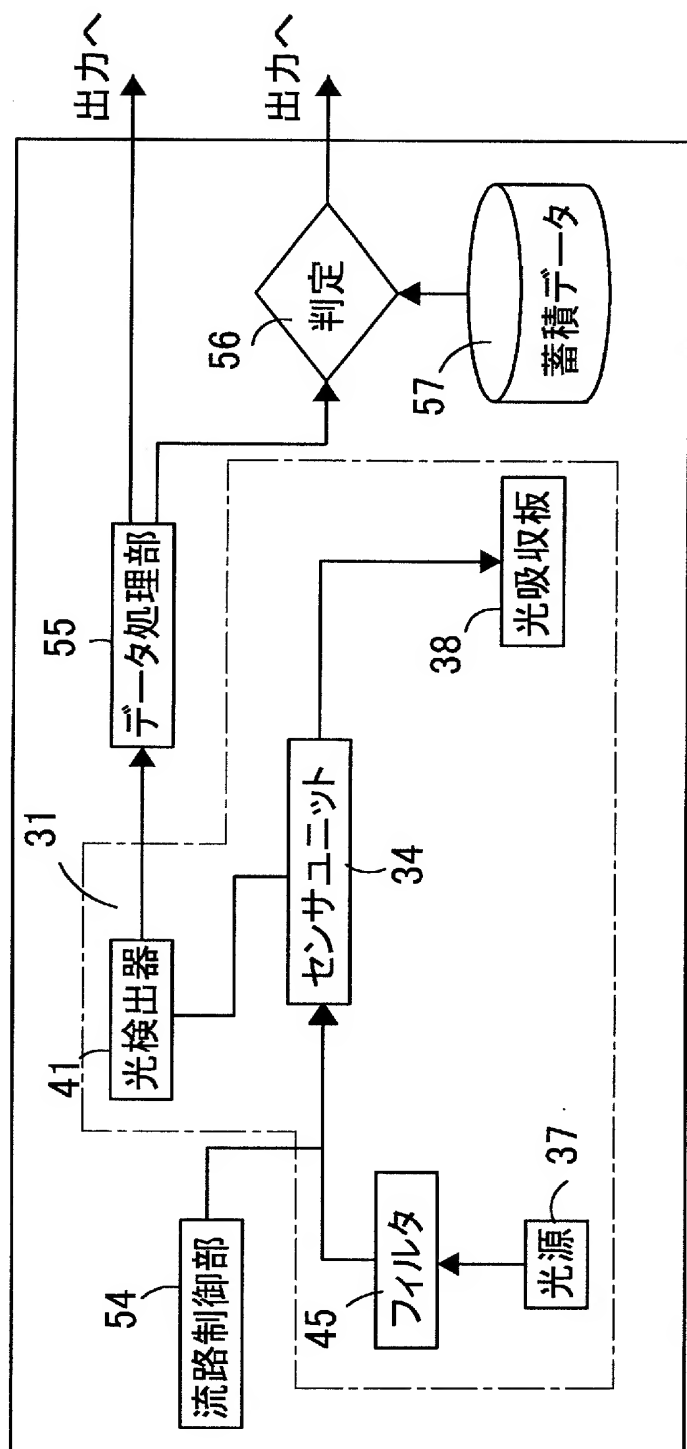
(a)



(b)







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 エバネッセント光と金属微粒子とを局在プラズモン共鳴させることにより強い電界を金属微粒子近傍に閉じ込め、金属微粒子近傍の狭い範囲にある検体を修飾している発光分子だけを発光させる。これにより検出精度の高い新規な構成の局在プラズモン共鳴センサを提供する。

【解決手段】 透明基板 3 2 の表面に金属微粒子 3 3 を間をまばらに固定し、特異的なリガンドを吸着する受容体 3 5 を透明基板 3 2 又は金属微粒子 3 3 の上に固定する。透明基板 3 2 下面にはプリズム 3 6 を密着させてあり、プリズム 3 6 を通して透明基板 3 2 に励起光を入射させる。入射光は透明基板 3 2 の表面で全反射し、当該表面に発生したエバネッセント光と金属微粒子 3 3 が局在プラズモン共鳴する。金属微粒子 3 3 と受容体 3 5 を設けられた面を発光分子で修飾されたリガンドを含んだ分析試料液に接触させると、受容体に吸着された特異性のリガンドを修飾している発光分子が発光する。

【選択図】 図 4

出願人履歴

0 0 0 0 0 2 9 4 5

20000811

住所変更

京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町8 0 1 番地
オムロン株式会社